

• 实验研究 •

乳腺癌 Runx3 基因启动子甲基化状态及其与病理特征的关系

田声望 贾绍昌 陈坚

【摘要】 目的 探讨乳腺癌组织中 Runx3 基因启动子甲基化状态及其与乳腺癌临床病理特征之间的关系。方法 2007年2月至2009年4月收集经病理确诊的56例乳腺癌患者癌组织及相应的癌旁组织。采用甲基化特异聚合酶链反应检测 Runx3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态,并检测其对 Runx3 基因表达的影响和分析其与乳腺癌临床病理特征之间的关系。统计学分析采用 χ^2 检验和 Pearson 相关分析法。结果 乳腺癌组织中 Runx3 基因启动子区 CpG 岛甲基化率(55.4%)显著高于癌旁组织中的甲基化率(10.7%),二者之间差异有统计学意义($\chi^2 = 25.225, P = 0.000$)。Runx3 基因的异常甲基化和乳腺癌患者的临床分期及淋巴结转移有关($P = 0.018, P = 0.010$),但与患者的年龄、肿瘤直径大小及组织学类型无关($P > 0.050$)。Runx3 mRNA 表达与 Runx3 启动子甲基化呈弱相关($r = 0.343, P = 0.010$)。结论 Runx3 基因启动子甲基化状态导致 Runx3 基因 mRNA 表达降低或缺失。Runx3 基因启动子区甲基化可能是导致 Runx3 基因在乳腺癌中失活的分子机制之一。

【关键词】 乳腺肿瘤; Runx3 基因; 启动子; 甲基化; 甲基化特异性聚合酶链反应

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Analysis of the status of Runx3 gene promoter methylation in breast cancer and its relationship with pathological features TIAN Sheng-wang, JIA Shao-chang, CHEN Jian. Jintan People's Hospital, Jintan 213200, China

【Abstract】 **Objective** To analyze the status of Runx3 gene promoter methylation and explore its association with the expression of Runx3 gene and clinicopathological factors of breast cancer. **Methods** From February 2007 to April 2009, a total of 56 breast cancer tissue samples and corresponding pericancer tissues were collected and used for this study. All samples were confirmed pathologically. Methylation-specific PCR (polymerase chain reaction) was performed to detect the promoter hypermethylation of Runx3 gene, and analyze its influence on the expression of Runx3 gene and the relationship between Runx3 promoter methylation and clinicopathological factors in breast cancer. Chi-square test and Pearson test were used for statistical analysis. **Results** The rate of promoter hypermethylation of Runx3 gene in the breast cancer tissues (55.4%) was significantly higher than that in the pericancer tissues (10.7%), with statistical difference between the two ($\chi^2 = 25.225, P = 0.000$). Runx3 gene hypermethylation was related with clinical staging and lymph node metastasis ($P = 0.018, P = 0.010$), but not related with the age, tumour size and histological types ($P > 0.050$). There was a light association between the expression

作者单位:213200 金坛,江苏省金坛市人民医院肿瘤内科(田声望);210012 南京,解放军八一医院全军肿瘤中心(贾绍昌,陈坚)

通信作者:贾绍昌, E-mail: jiashaochang@sina.com

of Runx3 mRNA and Runx3 promoter methylation ($r = 0.343, P = 0.010$).

Conclusions Runx3 promoter methylation can lead to a decrease or absence in the runx3 mRNA expression in breast cancer. The promoter methylation of Runx3 gene can induce the inhibition of Runx3 mRNA expression, which might be one of the mechanisms of Runx3 gene inactivation in human breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Runx3 gene; Promoter regions, Methylation; Methylation-specific PCR

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,据资料统计,发病率占全身各种恶性肿瘤的 7.0%~10.0%,且呈现发病率逐年升高趋势^[1]。目前,乳腺癌发病的分子机制尚不清楚。有研究报道 Runt 相关转录因子 3(Runx3)基因失活与乳腺癌的发生相关^[1]。近年来,对肿瘤抑制基因启动子区 CpG 岛的过度甲基化作了大量研究,确认肿瘤抑制基因启动子区 CpG 岛的过度甲基化是肿瘤抑癌基因失活的一个重要机制^[2]。国内外研究表明,在恶性胶质瘤、肝细胞癌、胃癌等多种肿瘤组织中可以检测到 Runx3 基因的甲基化^[3-5]。另外,国内虽有关于乳腺癌组织中 Runx3 基因甲基化状态方面的报道,但仅局限于甲基化状态的检测以及临床预后意义判断,对于 Runx3 基因在乳腺癌组织中甲基化状态对该基因表达影响及临床病理意义并不清楚^[6-8]。为探讨 Runx3 基因甲基化状态在乳腺癌发生、发展过程中的变化和意义、明确乳腺癌的发生、发展机制及为预后判断提供检测指标,本实验研究采用甲基化特异性聚合酶链反应法(MSP)检测了乳腺癌组织及相应癌旁正常乳腺组织中 Runx3 基因的甲基化状态并分析其对 Runx3 基因 mRNA 表达的影响及其与乳腺癌临床病理特征之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集解放军八一医院全军肿瘤中心及江苏省金坛市人民医院 2007 年 2 月至 2009 年 4 月乳腺癌组织标本 56 例。将瘤体及距瘤体约 5cm 的癌旁正常乳腺组织取材并进行检测。患者均为女性,年龄 35~68 岁,平均 52 岁。所有患者术前均未接受过放疗和化疗。组织标本按 1997 年 UICC (Union International Centre of Cancer) 乳腺癌 TNM 分期标准进行诊断并分类。所有标本均有组织病理学和/或细胞学诊断依据,保存于-70℃备用。

1.2 组织标本的前处理及基因组 DNA 提取

取冻存组织标本 0.3~0.5 cm³ 剪碎,加 0.5 ml TE 缓冲液进行匀浆。采用本实验室试剂,用蛋白酶 K 消化-氯仿抽提法抽提取组织 DNA,以 TE 缓冲液溶解,用紫外线分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处光密度值(OD)。

260 nm处与 280 nm 处 OD 的比值在 1.8~2.0 之间认为所提取的 DNA 纯度最佳,小于 1.8 就证明有酚或者蛋白污染,大于 2.0 就说明降解成单核苷酸的情况比较严重^[9]。

1.3 Runx3 基因启动子甲基化分析

按修饰试剂盒说明将基因组 DNA 进行甲基化修饰,修饰后的 DNA 在 -20 °C 贮存备用。纯化回收 DNA 用于 MSP-PCR (methylation-specific PCR) 分析。Runx3 基因甲基化和去甲基化引物参照文献^[3],甲基化(M)上游引物序列:5'-ATAATAGCGGTCGTTAGGGCGTCG-3',下游引物序列:5'-GCTTCTACTTTCCCACT TCTCACA-3';非甲基化(U)上游引物序列:5'-ATAATAGTTGTTGTTAGGGTGTTG-3',下游引物序列:5'-ACTTCTACTTTCCCACT TTCTCACA-3'。PCR 反应体系:修饰后的 DNA 200 ng,10×PCR 缓冲液 1 μL,三磷酸脱氧核苷酸(dNTP,10 mmol/L) 1 μL,MgCl₂ (25 mmol/L) 3.0 μL,甲基化上、下游引物(20 pmol/μL)各 0.8 μL或非甲基化上、下游引物(20 pmol/μL)各 0.8 μL,DNA 聚合酶(Taq,5 U/μL) 0.5 μL,蒸馏水补至 20 μL。采用热启动 PCR,PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 40 s,58 °C 45 s,72 °C 45 s,共 40 个循环;72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 反应产物加入 2 μL 6×上样缓冲液,于 2%琼脂糖凝胶上电泳,自动电泳凝胶成像分析系统扫描分析。

1.4 RT-PCR 检测 Runx3 基因的表达

采用 Trizol 法提取组织总 RNA,具体方法参照 Trizol 使用说明书(Takara 公司),经逆转录后再以 cDNA 为模板扩增。Runx3 基因根据 GeneBank 数据库(NG_007485)中人源 Runx3 基因 cDNA 序列合成,上游引物:5'-CCGGCC TTCCCCTGCGGCGG-3',下游引物:5'-GTAG TTCTCGTCATTGCCTG-3';内参 GAPDH 上游引物:5'-TTAGCACCCCT GGCCAAG-3',下游引物:5'-CTTACTCCTT GGAGGCCAT-3'。PCR 反应条件:94 °C 变性 3 min,以 94 °C 30 s,63 °C (Runx3)或者 63 °C (GAPDH) 30 s,72 °C 45 s,循环 35 次,72 °C 延伸 10 min。经 1.5%琼脂糖凝胶分离,将结果存入凝胶成像分析系统。

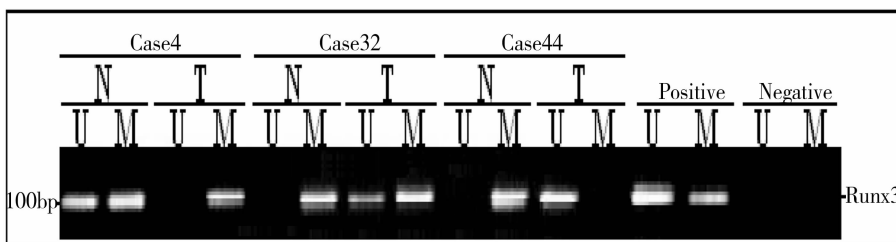
1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行处理。 χ^2 检验分析不同组间 Runx3 基因甲基化差别及肿瘤组织 Runx3 基因甲基化与临床病理参数关系,用 Pearson 列联系数法分析 Runx3 基因表达与其启动子甲基化状态之间的关联性, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织及对应癌旁组织中 Runx3 基因启动子甲基化分析结果

56 例乳腺癌组织标本中,31 例检测到 Runx3 基因启动子区 CpG 岛甲基化,相应的癌旁正常乳腺组织中 6 例检测到甲基化(图 1)。56 例乳腺癌组织和相应癌旁正常乳腺组织中 Runx3 基因甲基化阳性率分别为 55.4%(31/56)和 10.7%(6/56),二者间差异有统计学意义($\chi^2=25.225, P=0.000$)。

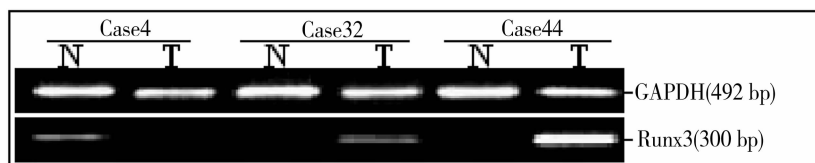


N:癌旁组织; T:肿瘤组织; U:未甲基化引物扩增; M:甲基化引物扩增; Positive:淋巴细胞 DNA; Negative:水

图 1 乳腺癌组织和对应癌旁组织基因组 DNA 中 Runx3 基因启动子甲基化检测

2.2 Runx3 基因在乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中的表达情况

为了检测 Runx3 基因启动子甲基化对 Runx3 基因表达水平的影响,进行了 RT-PCR 试验以检测该基因 mRNA 表达情况。如图 2 所示,在 Runx3 基因启动子呈甲基化状态的乳腺癌组织和癌旁正常乳腺组织中 Runx3 基因 mRNA 呈现不表达或者低表达状态,而在 Runx3 基因启动子呈未甲基化状态的乳腺肿瘤组织和癌旁正常乳腺组织中 Runx3 基因 mRNA 呈现高表达状态。对 56 例乳腺癌组织样本 Runx3 的表达水平与 Runx3 启动子区该特异位点的甲基化程度进行相关性分析,发现二者之间存在弱相关($r=0.343, P=0.010$;表 1)。由此推断 Runx3 基因在乳腺癌组织中的低表达或者表达缺失可能与 Runx3 基因启动子 CpG 岛的甲基化状态有关。



N:癌旁组织; T:肿瘤组织; GAPDH:内参照

图 2 RT-PCR 检测 Runx3 基因 mRNA 的表达

2.3 Runx3 基因启动子甲基化状态与乳腺癌临床病理特征的关系

乳腺癌组织中 Runx3 基因启动子区甲基化发生频率与患者的临床分期及淋巴结转移有关,(III+IV)期患者乳腺癌组织的甲基化率(70.0%)显著高

于(I+II)期患者(38.5%; $\chi^2 = 5.606, P = 0.018$);同时有淋巴结转移患者乳腺癌组织中甲基化率(75.0%)显著高于无淋巴结转移患者(40.6%; $\chi^2 = 6.557, P = 0.010$)。乳腺癌组织中 Runx3 基因启动子区甲基化与患者年龄、肿瘤大小及组织学类型无关($P > 0.050$, 表 2)。

表 1 乳腺癌 Runx3 表达与 Runx3 启动子甲基化之间的相关性(例)

Runx3 表达	Runx3 启动子甲基化状态		合计
	甲基化	未甲基化	
阴性	25	12	37
阳性	6	13	19
合计	31	25	56

$r = 0.343, P = 0.010$

表 2 乳腺癌 Runx3 甲基化与临床病理特征的关系

病理特征	例数	甲基化[例(%)]	未甲基化(例)	χ^2 值	P 值
年龄				0.259	0.611
≤45 岁	29	17(58.6)	12		
>45 岁	27	14(51.9)	13		
肿瘤直径				0.355	0.551
≤3 cm	38	20(52.6)	18		
>3 cm	18	11(61.1)	7		
临床分期				5.606	0.018
I + II	26	10(38.5)	16		
III + IV	30	21(70.0)	9		
组织学类型				0.010	0.922
乳腺小叶癌	22	12(54.5)	10		
乳腺导管癌	34	19(55.9)	15		
淋巴结转移				6.557	0.010
无	32	13(40.6)	19		
有	24	18(75.0)	6		

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。近年来乳腺癌发病率呈逐年增加趋势,已居于各种恶性肿瘤发病数第二位,病死率居第五位。数十年以来,国内外专家对乳腺癌的病因及分子机制进行了深入研究和探讨。但是,既往的研究和报道主要集中在基因突变、缺失遗传学机制与肿瘤发生的关系;近年来研究发现:表观遗传学机制与肿瘤的发生、发展密切相关,基因组 DNA 尤其是启动子区 CpG 岛甲基化状态的改变可以引起基因表达的沉默进而导致基因结构及功能的异常^[10]。文献报道,60%的人类基因 5'端启动子区存在 CpG 岛^[11],这些 CpG 岛的甲基化对 DNA 结构、构型和稳定性起着重要作用及控

制基因表达。据报道,乳腺癌中很多基因的启动子区域发生了 CpG 岛的高甲基化,从而导致该基因的表达沉默,推断 DNA 的高甲基化状态可能是乳腺癌发生发展的一个重要分子机制^[12]。

Runx3 是一种新发现的定位于 1p36.1 的抑癌基因,广泛表达于上皮细胞、间叶细胞、血液细胞及神经细胞等^[13]。Runx3 是 RUNT 基因家族的成员之一, RUNT 基因家族是由 Runx1、Runx2、Runx3 等三个成员组成,其编码蛋白是一组 DNA 结合转录因子,在细胞的生长、发育及凋亡过程中起着重要的作用^[14]。Runx3 蛋白是 TGF- β 信号通路下游的一个转录因子, TGF- β 信号通路对维持细胞正常生长发育起重要作用,并可能与肿瘤发生发展密切相关。最近有研究表明 Runx3 基因在胃癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、膀胱癌中有表达缺失或者降低,提示 Runx3 基因可能是一种新的抑癌基因^[15]。倪志等研究发现,用特异性甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 可逆转 Runx3 启动子高甲基化状态,抑制结肠癌细胞生长,诱导部分结肠癌细胞凋亡^[16]。文献还表明,激活肝癌细胞的 Runx3 表达可以显著抑制肝癌细胞的生长和成瘤性并增强其化疗敏感性^[17]。因此可以说明 Runx3 基因的表达缺失或者下调与肿瘤的发生、发展密切相关,Runx3 基因启动子区 CpG 岛的高甲基化状态可能在人类肿瘤发生分子机制中起着重要的作用。Runx3 基因虽然已经被证明在乳腺癌组织中呈现低表达状态,但是其在乳腺癌中的甲基化状态并不清楚。本研究分析了 Runx3 基因在乳腺中甲基化状态及其对该基因表达的影响和临床意义。结果表明:(1)乳腺癌 Runx3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化率(55.4%)明显高于癌旁组织(10.7%),说明 Runx3 基因异常甲基化在乳腺癌组织中具有肿瘤特异性,很可能是乳腺癌发生发展过程中的一个早期频繁事件,与乳腺癌的发生、发展有关;(2)发现在 Runx3 基因发生甲基化的肿瘤组织或癌旁组织中,Runx3 基因的表达明显降低,提示 DNA 甲基化可能是该基因失活的重要机制;(3)乳腺癌组织样本 Runx3 的表达水平与 Runx3 启动子区该特异位点的甲基化程度进行相关性分析,发现二者之间呈弱相关($r=0.343$, $P=0.010$),因此推断 Runx3 基因在乳腺癌组织中的低表达或者表达缺失可能与 Runx3 基因启动子 CpG 岛的甲基化状态相关;(4) Runx3 基因甲基化与乳腺癌的临床分期和淋巴结转移有关($P<0.050$),但是与患者的年龄、肿瘤直径大小及组织学类型临床特征无关($P>0.050$)。由于本研究组织样本量较小,因此 Runx3 基因的甲基化状态及其临床意义分析还有待于大样本量做一步验证。

总之,本研究结果将有助于从分子水平揭示乳腺癌的病因,对乳腺癌的早期预防和早期诊断具有重要意义。Runx3 基因甲基化有望成为对乳腺癌高

危人群筛选的一项重要候选指标。同时为相关抑癌基因的分子发病机制的研究、甲基化干预措施有效的应用、乳腺癌等相关恶性肿瘤的治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al. Breast cancer. *Lancet*, 2005, 365:1727-1741.
- [2] Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a bright future. *Oncogene*, 2002, 21:5427-5440.
- [3] 谢源阳, 袁贤瑞, 李学军, 等. RUNX3 基因在脑胶质瘤中的表达和启动子区甲基化的研究. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2009, 15:1-5.
- [4] 张海元, 赵薇, 班静. 血浆 Runx3 基因启动子甲基化检测诊断早期肝细胞癌的临床价值. *山东医药*, 2009, 49: 76-77.
- [5] Hsu PI, Hsieh HL, Lee J, et al. Loss of RUNX3 expression correlates with differentiation, nodal metastasis, and poor prognosis of gastric cancer. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16: 1686-1694.
- [6] 杜金荣, 娄阁, 姜影. RUNX3 基因启动子甲基化与乳腺癌临床病理特征及预后因素的关系. *哈尔滨医科大学学报*, 2008, 42: 53-56.
- [7] 姜影, 佟丹丹, 张颖. RUNX3 基因表达对判断人乳腺癌预后的价值. *临床与实验病理学杂志*, 2007, 23: 275-278.
- [8] 谢黎明, 贺荣芳, 姜浩. RUNX3 和 CerbB-2 在乳腺癌组织中的表达及其意义. *海南医学*, 2008, 19: 10-11.
- [9] Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 130: 118-126.
- [10] Jones PA. DNA methylation and cancer. *Cancer Res*, 1986, 46: 461-466.
- [11] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 2003, 349: 2042-2054.
- [12] 卓志红, 龚朝辉. DNA 甲基化与乳腺癌. *癌变畸变突变*, 2008, 20: 32-35.
- [13] Ito Y. RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes. *Adv Cancer Res*, 2008, 99: 33-76.
- [14] Bae SC, Lee YH. Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: the molecular basis of RUNX regulation. *Gene*, 2006, 366: 58-66.
- [15] Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, et al. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796: 315-331.
- [16] 倪志, 鲍曼夕, 刘南植, 等. 结肠癌 Lovo 细胞 RUNX3 基因的表达与其增殖及凋亡的关系. *世界华人消化杂志*, 2008, 16: 711-715.
- [17] Li X, Zhang Y, Zhang Y, et al. RUNX3 inhibits growth of HCC cells and HCC xenografts in mice in combination with adriamycin. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 669-676.

(收稿日期:2009-10-28)

(本文编辑:范林军)

田声望, 贾绍昌, 陈坚. 乳腺癌 Runx3 基因启动子甲基化状态及其与病理特征的关系[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2010, 4(5):581-587.